

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

09/269703
PCT/JP 97/03499

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

01.10.97

01 DEC 1997

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1996年10月 2日

出 願 番 号
Application Number:

平成 8年特許願第281421号

出 願 人
Applicant(s):

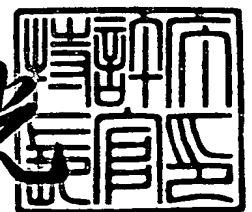
坂本 賢二

PRIORITY DOCUMENT

1997年11月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3092164

【書類名】 特許願

【整理番号】 96472

【提出日】 平成 8年10月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明の名称】 生理活性物質の探索方法及び製造方法

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 秋田県雄勝郡皆瀬村畑等字鳥谷 1 2 番地

 【氏名】 坂本 賢二

【特許出願人】

 【識別番号】 595061370

 【氏名又は名称】 坂本 賢二

【代理人】

 【識別番号】 100088546

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 谷川 英次郎

 【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

 【納付方法】 特許印紙

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 委任状 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生理活性物質の探索方法及び製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 拮抗作用を有する物質若しくは細胞が生体中に存在する物質のレセプター、又は物質が作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する物質のレセプターであって、同一のレセプターにつき2種類以上のサイズのものが存在するレセプターのアミノ酸配列を調べ、長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを調べることを含む生理活性物質の探索方法。

【請求項2】 前記レセプターは7回膜貫通型のレセプターである請求項1記載の方法。

【請求項3】 請求項1又は2記載の方法により判明した欠失領域又はその誘導体を作製することから成る、生理活性ペプチドの製造方法。

【請求項4】 上記欠失領域を作製することから成る、請求項3記載の方法

。

【請求項5】 前記欠失領域を化学合成により合成する請求項4記載の方法

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な各種生理活性物質の探索方法及び製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、未知の生理活性物質の探索は、体液や組織中に存在する成分を分析し、新規な物質を同定及び単離し、発見された新規な物質の生理活性を調べることにより行なわれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

上記した従来の方法は、何の予測もなくただ生体中の成分を分析し、新たな物

質を見つけ出してその生理活性を調べるだけである。しかしながら、生体中には極めて多くの成分が存在するし、生理活性物質はしばしば低濃度でしか存在しないから新規な物質を見つけることは困難な仕事である。しかも、生体は非常に多くの生理反応を行なっているので、新たに見つかった物質がどのような生理活性を有しているかを見つけることも困難である。このように、従来の方法では、新規な生理活性物質を見つけだすのは困難な作業である。

【0004】

従って、本発明の目的は、一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本願発明者は、拮抗作用を有する物質若しくは細胞が生体中に存在する物質のレセプター、又はある物質Aが作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する該物質Aのレセプターであって、同一のレセプターにつき2種類以上のサイズのものが存在する場合があります、その欠失部分、つまりスプライスされた部分のアミノ酸配列が生理的意義を持つことを見出した。例えば、カルシトニン受容体は破骨細胞上のカルシトニン受容体と結合して破骨細胞による骨吸収を抑制し、一方、破骨細胞の作用と拮抗作用を有する骨芽細胞が存在する。カルシトニン受容体は既にアミノ酸配列が報告されているが、サイズの異なる2種類以上のものが報告されている。本願発明者は、この2種類以上のサイズのカルシトニン受容体のうち、より長い方のレセプターの1領域が切断されてより短い方のレセプターになること、及びこの切断された領域が、カルシトニンが作用する破骨細胞の作用と拮抗する作用を有する骨芽細胞に対して作用するであろうことを洞察した。そして、この切断領域を化学合成して調べたところ、この新規なペプチドは骨芽細胞上のレセプターに結合して骨形成を促進することが確認された。これにより、本願発明者の上記の洞察が正しかったことが明らかになり、本発明が完成された。

【0006】

すなわち、本発明は、拮抗作用を有する物質若しくは細胞が生体中に存在する

物質のレセプター、又は物質が作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する物質のレセプターであって、同一のレセプターにつき2種類以上のサイズのものが存在するレセプターのアミノ酸配列を調べ、長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを調べることを含む生理活性物質の探索方法を提供する。また、本発明は、上記本発明の方法により判明した欠失領域又はその誘導体を作製することから成る、生理活性ペプチドの製造方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の方法では、拮抗作用を有する物質若しくは細胞が生体中に存在する物質のレセプター、又はある物質Aが作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する該物質Aのレセプターに着目する。拮抗作用は生体の恒常性を保つ上で基本的なものであり、生体内には互いに拮抗作用を有する物質又は細胞が非常に多く存在する。拮抗作用を有する物質又は細胞が生体中に存在する物質のレセプター並びにある物質Aが作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する該物質Aのレセプターの例としては、カルシトニン（これが作用する破骨細胞が骨芽細胞と拮抗）レセプター、グルカゴン（インシュリンと拮抗）レセプター、ソマトスタチン（成長ホルモンと拮抗）レセプター、副甲状腺ホルモン（カルシトニン等と拮抗）レセプター等多数のレセプターがある。レセプターとしては、カルシトニンレセプターのような7回膜貫通型のレセプターが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0008】

本発明の方法では、これらのレセプターのアミノ酸配列又はサイズを調べ、同じレセプターでありながら、サイズが異なるものを見つけ出す。この作業は、当該レセプターのアミノ酸配列又はサイズを複数回決定することにより行なってもよいし、文献に報告されている場合にはその報告を利用してもよい。同一のレセプターでありながらサイズの異なる2種類以上のものが存在するレセプターの例として、カルシトニンレセプター、グルカゴンレセプター、ソマトスタチンレセプター等を挙げることができる。

【0009】

同一のレセプターについてサイズの異なる2種類以上のレセプターが存在することを見つけ出した後、それら2種類以上のレセプターのアミノ酸配列を比較し、長いレセプターのどの領域が欠失して短いレセプターとなっているかを調べる。短いレセプターにおいて欠失している領域が、当該拮抗作用に対して何らかの作用を有する生理活性物質である。つまり、スプライスされた構造のうちあるものが生理活性物質である。すなわち、生理活性物質がレセプターに結合することにより、そのレセプターの一部が切断され、この切断されたレセプター断片が当該拮抗作用に対して調節的な作用等の生理活性を示すものと考えられる。例えば、下記実施例に具体的に示されるように、カルシトニンレセプターにおけるこの欠失領域が骨芽細胞上のレセプターに結合し、骨形成を促進することが確かめられた。

【0010】

上記方法により見出される欠失領域は生理活性を有するから、これを製造することにより生理活性物質が得られる。多くの場合、欠失領域は比較的短いペプチドから成るので、このような場合には市販のペプチド合成機を用いて、化学合成により容易に当該生理活性物質を作製することができる。あるいは、常法により遺伝子工学的手法を用いて作製することもできる。

【0011】

得られた生理活性物質の生理活性は、上記拮抗作用に関与するものであるから、それぞれの拮抗作用に応じた適宜の方法により容易に確認することができる。

【0012】

なお、一般に生理活性を有するペプチドにおいて、その少数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換し、少数のアミノ酸が付加され、又は少数のアミノ酸が欠失した場合でも、その生理活性が維持される場合があることは当業者に周知の事実である。従って、上記の欠失領域を構成するアミノ酸のうち、少数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換し、少数のアミノ酸が付加され、又は少数のアミノ酸が欠失したものであって、上記欠失領域から成る生理活性物質が持つ生理活性を有する物質（本願発明においてこのような物質を上記欠失領域の「誘導体」という）を製造

することも本発明の範囲に含まれる。このような誘導体は上記欠失領域に対し、70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有することが好ましい。

【0013】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0014】

実施例1 カルシトニンレセプターの欠失領域の決定

カルシトニンレセプターのアミノ酸配列はJournal of Clinical Investigation, 第90巻、第5号(1992)に記載されている。ここに記載されたカルシトニンレセプターのアミノ酸配列を比較すると、短い方のアミノ酸配列では、長い方のアミノ酸配列の第175番目～第190番目のアミノ酸配列が欠失している。この欠失領域のアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0015】

実施例2 ペプチドの製造

市販のペプチド合成機を用い、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。

【0016】

実施例3 骨芽細胞増殖促進作用

骨芽細胞であるラット由来ROS細胞(入手先:ATCC)を10%牛胎児血清を含むF10培地(入手先:大日本製薬)にて培養し、5%炭酸ガス加湿37℃恒温器内にて育成した。トリプシン処理により24穴培養プレートに1×10⁵個/穴(well)蒔種し、コンフルエントになったところで培地を1%牛胎児血清F10培地に交換し、24時間培養した。その後、実施例2で製造した本発明のペプチドを1%牛胎児血清F10培地に溶解し、容量を変化させながらwell1に加えてさらに24時間培養を継続した。培養後、本ペプチドによる細胞の増殖促進効果をMTTアッセイにより測定し、非処理群に対する増殖促進効果を求めた。なお、MTTアッセイ及び増殖促進率の算出は具体的には次のように行った。フナコシ(株)より市販されているMTF-Cell-Growth A

assay kitの手順に従い、本物質を用量を変化させながらウェルに加え一昼夜放置後、生細胞のミトコンドリア中に存在する酵素によりMTT (3-4,5Dimethylthiazol-2YL)-2,5Diphenyl Tetrazolium bromide が暗青色のホルマザンに開裂する現象を利用し比色法にて生細胞を計数した。本物質を加えない対照群を100%とし用量を変化させて加えた群の比色度を求めると次のようになった。結果を下記表1に示す。

【0017】

【表1】

ペプチド添加量	増殖促進率
(μ g/well)	(%)
0	100.0
0.001	109.6
0.01	110.5
0.1	636.2
1.0	1317.1

【0018】

表1から明らかなように、本発明の方法により探索された上記ペプチドは、骨芽細胞に対し増殖促進的に作用することが確認された。従って、本ペプチドは骨量の増加に結びつくものと考えられ、骨粗鬆症等の骨疾患の治療に対し有用である。

【0019】

実施例3 本ペプチドに対する骨芽細胞上の受容体の存在

本ペプチドが骨芽細胞に対し増殖促進作用があることが判明したことにより、骨芽細胞が本ペプチドに対する受容体を持っていることが推察される。もし受容体が存在するならば本ペプチドは生命にとり根源的な物質であることが考えられ、次に骨芽細胞に受容体が存在するか否かを調査した。

【0020】

実施例2で得られたペプチドをビオチンで標識し、実施例3と同様に培養したROS細胞に一定量に標識した本ペプチドを加え、さらに競合反応をさせるために非標識の本ペプチドを10%牛胎児血清F10培地に溶解し、容量を変化させながら加えて競合反応を見た。この実験操作は具体的には次のように行った。SUMILON社製の蛋白ビオチン化標識キットの手順に従い本ペプチドをビオチン化し、ウェルに播種された一定数の細胞に対し一定量のビオチン化ペプチドを加え非標識ペプチド0～0.512 $\mu\text{g}/\text{well}$ を各々加え競合反応を6時間行い、その後、細胞をPBSにて洗浄しストレプトアビジンで標識したペルオキシダーゼで細胞表面にある受容体に結合したビオチン化ペプチドに反応して発色反応を見る。細胞表面に本ペプチドの受容体が存在すれば非標識のペプチドと競合反応が起こり発色強度は低下する。結果を下記表2に示す。

【0021】

【表2】

非標識体添加量 ($\mu\text{g}/\text{well}$)	加えた標識体に対する割合 (%)
0	100
0.032	98.4
0.064	86.5
0.128	79.6
0.256	34.1
0.512	29.5

【0022】

表2に示されるように、非標識体の添加量に依存して加えた標識体に対する割合が変化しているので、骨芽細胞が本ペプチドに対する受容体を持っていることは明らかであり、本物質が根源的な役割を担っていることが推察される。

【0023】

急性毒性試験

実施例2で作製したペプチドについて、d d y 雄性マウス（体重40～45 g）を用い、その急性毒性を試験した。本ペプチドを生理食塩水（pH 6.0）に溶解し、これをマウスの尾静脈より投与し、14日間観察した。投与量は1、10、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とした。この結果を下記表3に示す。

【0024】

【表3】

投与量	
($\mu\text{g}/\text{kg}$)	死亡匹数
1	0/5
10	0/5
100	0/5

【0025】

実施例4 グルカゴンレセプターの欠失領域の決定

実施例1と同じ方法により、FEBS Letters 351 (1994) 271-275 に記載されたグルカゴンレセプターのアミノ酸配列を比較することにより、長い方のレセプターに存在するが短い方のレセプターにおいて欠失している領域のアミノ酸配列を決定した。決定された欠失領域のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0026】

実施例5 ソマトスタチンレセプターの欠失領域の決定

実施例1と同じ方法により、Molecular Pharmacology 44:1008-1015(1993) に記載されたソマトスタチンレセプターのアミノ酸配列を比較することにより、長い方のレセプターに存在するが短い方のレセプターにおいて欠失している領域のアミノ酸配列を決定した。決定された欠失領域のアミノ酸配列を配列番号3に示す。

【0027】

【発明の効果】

本発明により、一定の予測性をもって効率的に新規な生理活性物質を探索する方法が初めて提供された。本発明の方法では、拮抗作用に関与する物質のレセプターを調べることにより新規な生理活性物質を見つけることができるので、従来のように極めて多様な成分を含む生体試料中に微量含まれる生理活性物質を単離する必要がない。また、探索された生理活性物質の生理活性は、上記拮抗作用に関与するものであるから、その生理活性を探索することも従来に比べてはるかに容易である。よって、本発明の方法によれば、従来よりもはるかに高効率に新規な生理活性物質を探索することができる。

【0028】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：

配列の型：アミノ酸

配列

Lys Leu Thr Thr Ile Phe Pro Leu Asn Trp Lys Tyr Arg Lys Ala Leu

1

5

10

15

【0029】

配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：アミノ酸

配列

Gly Asn Gly Val Val Ser Ala Trp Glu Ala Glu Gly Ala Lys Ser Gly

1

5

10

15

Ser Gly Leu Thr Arg Ala Tyr Thr His Val Pro

20

25

【0030】

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

配列

Pro Ser Cys Gln Trp Val Gln Ala Pro Ala Cys Gln

1

5

10

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法を提供すること。

【解決手段】 拮抗作用を有する物質若しくは細胞が生体中に存在する物質のレセプター、又は物質が作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する物質のレセプターであって、同一のレセプターにつき2種類以上のサイズのものが存在するレセプターのアミノ酸配列を調べ、長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを調べることを含む生理活性物質の探索方法を提供した。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595061370
【住所又は居所】 秋田県雄勝郡皆瀬村畑等字鳥谷12番地
【氏名又は名称】 坂本 賢二

【代理人】

申請人
【識別番号】 100088546
【住所又は居所】 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル
6階 谷川国際特許事務所
【氏名又は名称】 谷川 英次郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[595061370]

1. 変更年月日 1995年 4月 3日

[変更理由] 新規登録

住 所 秋田県雄勝郡皆瀬村畑等字鳥谷12番地

氏 名 坂本 賢二

